

**Erprobung von Methoden zur Bewertung der
Verträglichkeit von Flüssigkeiten
an der Conjunctiva des Kaninchenauges**

Bernhard Allgayer

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551910_0037

Aus dem Institut
für Medizinische Balneologie und Klimatologie
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Drexel

Erprobung von Methoden zur Bewertung der
Verträglichkeit von Flüssigkeiten
an der Conjunctiva des Kaninchenauges

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Bernhard Allgayer
aus München

1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Drexel
2. Berichterstatter:	Dipl. Phys. Dir. Dirnagel
3. Berichterstatter:	Prof. Dr. Naumann
Dekan:	Prof. Dr. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 23.3.1976	



DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Thema: Erprobung von Methoden zur Bewertung der Verträglichkeit
von Flüssigkeiten an der Conjunctiva des Kaninchenauges

	Seite
Einleitung	1
1. Vorbemerkungen	2
1.1. Anatomie der Bindehaut	2
1.2. Reizzeichen der Bindehaut	2
1.3. Infektiöse Konjunktivitis	3
1.4. Gewebeschädigung durch chemische Substanzen	3
2. Fragestellung der Arbeit	4
3.0 Literaturübersicht	4
3.1.1. Wickeltechnik	4
3.1.2. Fleckchentechnik	5
3.1.3. Injektionstechnik	5
3.1.4. Tests auf der Haut des Menschen	6
3.1.5. Testverfahren, die Mucosa von Versuchstieren zu reizen	6
4. Methoden, die Reizung der Schleimhaut zu beurteilen	
4.1. Reizbewertung nach Punkten	7
4.2. Messung von Entzündungszeichen, quantitativ	7
4.2.1. Bestimmung der Entzündungstemperatur	7
4.2.2. Messung der Liddicke	8
4.2.3. Beurteilung der Rötung	9
5. Photographische Darstellungsverfahren	
5.1. Bindehautphotographie	
5.2. Aufnahmen mit Hilfe der Photospaltlampe	10

6.	Material und Methoden	11
6.1.1.	Versuchstiere	
6.1.2.	Reizbeurteilung	
6.1.3.	Punkteskala zur Reizbeurteilung	12
6.2.1.	Beschreibung der Methode nach Draize Meth. 1	
6.2.2.	Testung der Rheinfelder Sole nach Meth. 1	13
6.2.3.	Testung des K.-sees nach Meth. 1	14
6.2.4.	Testung des E.-sees nach Meth. 1	
6.2.5.	Testung des N.-sees nach Meth. 1	
6.3.1.	Weiterentwicklung der Meth. nach Draize (Methode 1 a)	15
6.3.2.	Testung der Rheinfelder Sole nach Meth. 1 a	
6.3.3.	Testung der Wasserprobe aus dem E.-see nach Methode 1 a	17
6.3.4.	Testung der Wasserprobe aus dem K.-see nach Methode 1 a	17
6.3.5.	Testung der Wasserprobe aus dem N.-see nach Methode 1 a	17
7.	Lidspannermethode (Methode 2)	
7.1.	Beschreibung der Methode 2	18
7.1.2.	Testung der Rheinfeldersole nach der Methode 2	19
7.1.3.	Testung der Wasserprobe aus dem E.-see nach der Methode 2	20
7.1.4.	Testung einer Wasserprobe aus dem K.-see nach der Methode 2	20
7.1.5.	Testung einer Wasserprobe aus dem N.-see nach der Methode 2	21
8.	Entwicklung einer neuen Methode	22
9.	Diskussion	24
9.1.	-der Wickel und Fleckchentechnik	24
9.2.	-des kurzfristigen Einträufelns	

	Seite
9.3. -des längerdauernden Einträufelns	25
9.4. -der Lidspannermethode	26
9.5. -der Perfusionsmethode	26
9.6. -der Reizbeurteilung	27
9.6.1. -der Reizbewertung nach Punkten	
9.6.2. -der quantitativen Meßverfahren	28
9.6.3. -der photographischen Meßverfahren	28
10. Zusammenfassung	29
11. Literaturangaben	32
12. Anhang A	33
13. Anhang B Bildteil	41
14. Anhang C Wasser-Analysen	44

Einleitung

Der Aufbau der menschlichen Haut gewährt dem Körper einen relativ guten Schutz gegen äußere Reize und gegen das Eindringen der meisten Flüssigkeiten. Studien auf dem Gebiet der Hautabsorption beweisen jedoch, daß die Haut bis zu einem gewissen Grad für bestimmte Substanzen durchlässig ist. Mit dem Fortschritt auf allen Gebieten der Medizin wurde auch die Anzahl von Präparaten größer, die für eine Oberflächenbehandlung der Haut in Frage kommen. Diese Substanzen müssen, bevor sie zur allgemeinen Verwendung freigegeben werden, hinsichtlich ihrer Hautverträglichkeit getestet werden.

Im Zusammenhang mit Arbeiten über die Rheinfelder-Sole ergab sich am Balneologischen Institut der Universität München die Fragestellung, eine Sole auf ihre Reizwirkung zu testen. In den Arbeiten von E. Hemmerich (15), H. Geiger (14), Ch. Gärtner (12) und M. Rabanser (16) wird die Reizwirkung der Sole auf die Haut ausgewählter Versuchspersonen in einer Testreihe untersucht. Meine Aufgabe war es, zusammen mit meinem Kollegen Peter Korzinek ein Verfahren zu entwickeln, das es ermöglicht, die Reizwirkung einer Sole auf die Schleimhaut zu erproben.

Für unsere Arbeiten empfohlen sich nach verschiedenen Autoren (1) die Konjunktiven am Kaninchenaugen, die neben den Meerschweinchenaugen die beliebtesten Testobjekte sind. Die in der Literatur beschriebenen Verfahren werden im Folgenden kurz dargestellt. Zum besseren Verständnis der Versuchsanordnungen werden einige Erörterungen zur Physiologie und Pathologie der Augenbindehaut vorangeschickt.

1. Vorbemerkungen

1.1. Anatomie der Bindehaut

Die Bindehaut erstreckt sich als Konjunktiva bulbi vom Limbus zur oberen und unteren Übergangsfalte (Fornix Conjunctivae) und geht von da als Konjunktiva tarsi auf die Innenseite der Lider über. Sie ist am Limbus und Tarsus fixiert, im übrigen frei beweglich und durchsichtig. Verfärbungen des Gewebes, wie subkonjunktivale Blutungen, kann man daher leicht erkennen. Im inneren Lidwinkel findet man eine Schleimhautduplikatur (Plica semilunaris) mit der Karunkel. Von den reichlich vorhandenen Blutgefäßen sind am reizfreien Auge nur wenige zu sehen, doch löst die geringste Irritation vermehrte Durchblutung und Rötung aus (nach W. Böke, 2).

1.2. Reizzeichen der Bindehaut

Die Konjunktivitis des Auges ist durch die Eigenart und die Intensität des pathogenen Reizes bestimmt. Die einfachste Reaktion des Auges ist die hyperämische Rötung der Konjunktiva tarsi, mit der wir uns auch am meisten in unseren Versuchen beschäftigen werden. Die Reizung tritt an der Konjunktiva bulbi als konjunktivale Injektion in Erscheinung, ziegelrote Gefäße herrschen vor. Sie sind einzeln gut erkennbar und mit der Bindehaut verschieblich. Ihre Anzahl nimmt zur Übergangsfalte hin zu. Stärkere Grade der Reizung rufen eine ödematöse Schwellung der Bindehaut hervor. Durch die Schwellung und durch die Hyperämie verschwinden die typischen Aspekte der Konjunktiva, nämlich das Durchscheinen der Fascia transorbitalis durch die untere Übergangsfalte und die deutliche Zeichnung der Meibomschen Drüsen im Tarsus des Unterlides.

Stets kommt es mehr oder weniger zur Absonderung eines Sekrets, das serös, schleimig oder eitrig sein kann und sich aus entzündlichem Transsudat, Konjunktivalsekret, Becherzellen, abgeschil-

fernten Epithelien und anderem zusammensetzt.

Die Einstufung einer Läsion als Konjunktivitis ergibt sich aus der exsudativen und proliferativen Entzündung der Bindehaut ohne Beteiligung der Iris.

1.3. Infektiöse Konjunktivitis

Schon im gesunden Zustand ist die Konjunktiva mikrobiell besiedelt. Bakterien und Viren können das Bild einer infektiösen Konjunktivitis erzeugen.

1.4. Gewebeschädigung durch chemische Substanzen

Der Grad der Gewebeschädigung durch eine chemische Substanz hängt vor allem ab von der Menge, Konzentration und dem pH des schädigenden Agens, sowie von seiner Einwirkungsdauer. In schweren Fällen sprechen wir je nach dem von einer Säure- oder Laugenverätzung.

Säuren führen zu einer Eiweißfällung im betroffenen Gewebe. Gelangen Spritzer stärkerer Säuren in den Bindehautsack, so kann man zwischen einer massiven primären Schädigung der unteren Bindehaut und der Hornhaut im Lidspaltenbereich und einer weniger starken sekundären im Bindehautsack unterscheiden, nachdem sich das Agens durch die Tränenflüssigkeit verteilt hat. Eine Verätzung 1. Grades zeigt ein Erythem der Lidhaut, umschriebene oder diffuse Rötung der Bindehaut mit starker Lichtscheu, Tränenträufeln und Blepharospasmus. Es besteht häufig ein massives, glasiertes Ödem der betroffenen Bindehaut (Chemosis Conjunctivae), vor allem im Lidspaltenbereich und im unteren Teil des Konjunktivalsackes. Die Hornhaut bietet eine Epitheltrübung oder eine sekundäre Erosion. Bei einer Verätzung 2. Grades bestehen an Haut und Lidhaut Blasenbildung mit starkem Lidödem und Ptosis. Die Reiztrias ist noch stärker ausgebildet. Nach passiver Öffnung der Lider sieht man eine massive Chemosis der Bindehaut, die um-

schriebene weißliche Ischämiebezirke zeigt. In deren Bereich ist mit Hilfe der Spaltlampe oft das Sistieren der Blutströmung in den Gefäßen der Bindehaut und der Episkleren zu erkennen. Die Hornhaut ist grauweiß getrübt und auch verdickt, meist mehr oder weniger entstellt und zeigt eine große Epithelerosion. Neben schnell nekrotisierenden Haut- und Bindehautschäden zeigt eine Verätzung 3. Grades, die von einer Verätzung 2. Grades nur schwer abzutrennen ist, vor allem eine weißliche Hornhauttrübung, wodurch der Einblick in das Auge unmöglich wird.

2. Fragestellung

Meine Aufgabe war es, zusammen mit Peter Korzinek ein Verfahren zu entwickeln, mit dessen Hilfe es möglich ist, die Reizwirkung von Lösungen, insbesondere von Solen, auf die Schleimhaut des Kaninchenauges zu testen. In meiner Arbeit soll die Verwertbarkeit aller bisher entwickelten Methoden untersucht werden. Ferner sollen die Vorarbeiten dargestellt werden, die schließlich zu der perfundierten Methode (siehe in 8.) führten. Bei der Entwicklung einer neuen Methode kam es besonders darauf an, die Art der Reizsetzung zu standardisieren. Eine statistische Absicherung der Ergebnisse mit der perfundierenden Methode hat Schmidt (13) in seiner Arbeit erreicht, die auf den Arbeiten von Korzinek und mir aufbaut.

3. Literaturübersicht

3.1. Techniken, die Reizwirkungen von Lösungen auf die menschliche Haut und auf die Haut von Versuchstieren zu testen.

3.1.1. Wickeltechnik

Versuchsvorgang: Im Experiment wird das Agens mit Hilfe eines wasserdichten Wickels oder Verbandes in ständigem Kontakt mit

der Haut des Versuchsobjekts gehalten. Die Wickel müssen genügend dick sein, um eine ausreichend große Menge von Testsubstanz aufnehmen zu können. Die Wickel sind je nach Körperbau des Versuchstieres in unterschiedlichen Ausführungen anzufertigen. Vor dem Zustandekommen eines Kontaktes zwischen der Haut des Versuchstieres und dem Wickel muß die Haut des Tieres gereinigt werden, beim Kaninchen rasiert werden. Nach dem Anlegen des Wickels wird das Versuchstier in eine bequeme Tierhaltevorrichtung gesetzt. Je nach Konzentration und pH der zu testenden Substanz wird der Wickel nach einer bestimmten Anzahl von Stunden wieder abgenommen. Die Auswertung erfolgt nach der abgewandelten Punkteskala von Friedenwald (4).

3.1.2. Patchtest - (Fleckchen)technik

Draize (1) verwendete noch eine andere abgewandelte Versuchstechnik, bei der er statt der Wickel 2 Lagen dünnes Verbandsmaterial auf die Haut der Versuchstiere legte. Die kleinen Quadrate werden mit einem Pflaster auf der Haut der Versuchstiere festgehalten. Die Testsubstanz wird unter die etwa 2 Quadratzentimeter großen Flecken eingeführt.

Die Auswertung erfolgt wiederum nach der von Friedenwald beschriebenen Punkteskala. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß gleichzeitig mehrere Substanzen getestet werden können.

3.1.3. Injektionstechnik

Landsteiner und Jackobs (6) verwendeten zu Versuchen weiße Meerschweinchen. Sie injizierten eine wässrige Lösung der Substanz, die sie testen wollten, in die gereinigte Haut der Versuchstiere. Dies wird mehrere Male zu verschiedenen Zeitpunkten wiederholt. Die erste Injektion wird mit 1 ml Testflüssigkeit durchgeführt, die folgenden Injektionen mit jeweils

0,5 ml Testlösung. 24 Stunden später wird die Höhe, der Durchmesser und die Farbe der Hautreaktion beurteilt und mit den Reaktionen auf die vorhergehenden Injektionen verglichen.

3.1.4. Tests auf der Haut von Menschen

Tests auf der menschlichen Haut müssen durch geeignete Tierversuche vorbereitet werden. Schwartz und Peck (5) beschrieben eine Methode zur Beurteilung leicht reizender Substanzen und der daraus entstehenden Kontaktdermatitis.

Der allgemeine Reizvorgang ist folgender:

2-6 verschiedene Substanzen werden für einen Test ausgewählt.

1 Quadratzentimeter große Scheibchen chirurgischen Verbandmaterials werden mit je 1 ml Flüssigkeit durchtränkt, dann auf der Oberfläche des Armes placiert und mit zusätzlichem Verbandsmaterial bedeckt. Nach einem festgesetzten Zeitraum wird abgelesen. Geiger (14), Gärtner (12), Hemmerich (15) und Rabanser (16) gingen nach diesem Verfahren vor. Es kann eine ekzematöse Reizung oder eine Kontaktdermatitis auftreten. Draize (1) beschrieb, wie die menschliche Haut auf diese Art leicht gereizt werden kann. Er verwendete dabei die einfache chemische Verbindung 2,4 Dinitrochlorobenzol und andere einfache chemische Substanzen. Die Frage, ob neue Mittel reizende Eigenschaften haben, kann sehr wichtig werden, besonders, wenn diese Mittel in Kontakt mit der menschlichen Haut, mit dem Gesicht oder mit dem Auge kommen. Das ideale Testobjekt für solche Versuche wäre der Mensch, im Normalfall ist aber aus naheliegenden Gründen dieser Weg nicht gangbar.

3.1.5. Testverfahren, die Mucosa von Versuchstieren zu reizen:

Zu Versuchen kann die Konjunktiva des Kaninchenauges und die Mucosa am Penis des männlichen Kaninchens herangezogen werden. Das Auge erweist sich als brauchbares Versuchsobjekt. Das Erythem und das Ödem werden anhand der Punkteskala von Frieden-

wald (4) ausgewertet. Annähernd 0,2 ml einer Substanz werden von ihm als ausreichend erachtet, eine sichtbare Reizung zu erzeugen. Wenn eine Lösung zu stark konzentriert ist und eine Nekrose erzeugt, wird die Substanz in ausreichender Verdünnung wieder verabreicht. Der Untersucher geht dabei so vor, daß das Ergebnis in der Punkteskala von Friedenwald (s.S.12) den Wert 4 nicht übersteigt.

Reaktionen werden gewöhnlich nach 1, 2 und 24 Stunden abgelesen. Das Vorgehen bei der Durchführung der Versuche ist einfach: Mit einer Pipette wird die Testsubstanz in den konjunktivalsack geträufelt.

4. Methoden, die Reizung der Schleimhaut zu beurteilen

4.1. Reizbewertung nach Punkten

Friedenwald (4) verwendete ein Punktesystem, um eine Abstufung der Verletzung am Kaninchenauge zu ermöglichen. Verletzungen der Cornea, der Konjunktiva und der Iris wurden getrennt bewertet. Die Skala ist auf S. 12 wiedergegeben.

Ein ähnliches Auswertungsverfahren verwendete auch Brock (7). Er belegte den jeweiligen Entzündungsgrad des Meerschweinchen- auges mit Maßzahlen, die er dann statistisch auszuwerten versuchte.

4.2. Messung von Entzündungszeichen quantitativ

Küchle und Löser (8) versuchten die 3 Kardinalsymptome der Entzündung: die Rötung, Schwellung und den Temperaturanstieg quantitativ zu bestimmen.

4.2.1. Bestimmung der Entzündungstemperatur

Zur Bestimmung der Entzündungstemperatur verwendeten die Autoren

einen Temperaturfühler. Er wurde unterhalb des Oberlides in das Auge eingeführt. Gleichzeitig wurde die Körpertemperatur des Tieres auf rektalem Wege gemessen, um so ein Maß für einen etwaigen Anstieg der Temperatur am Ort der Entzündung zu erhalten. Hierbei zeigte es sich, daß die Lidtemperatur etwa um 2 Grad Celsius unterhalb der Rektaltemperatur liegt. Die Differenz vermindert sich im Verlauf der Entzündung und kehrt parallel zum Abklingen der Entzündung wieder zum Ausgangsort zurück. Die Methode zeigte aber so große Schwankungen, daß eine exakte Auswertung nicht möglich war.

4.2.2. Messing der Liddicke

Bei der Messung der Liddicke als Ausdruck der entzündlichen Schwellung verwendeten Kückle und Löser (8) ein Gerät, das Brock (7) weiterentwickelte, wie in Folgendem beschrieben: "Das Instrument besitzt 2 zueinander parallel stehende Meßplatten, von denen die eine unter das Oberlid geschoben wird. Die obere Platte läuft beweglich in einer Schiene und steht über einem Faden, der 3mal um ein Schnurrädchen gewunden ist, mit einem Gegengewicht in Verbindung. Das Schnurrädchen ist über eine gemeinsame Achse mit einem Zeiger verbunden. Die Meßskala ist entsprechend der Kreisbewegung halbkreisförmig gebogen und so geeicht, daß ein Skalenteil einem Plattenabstand von 0,1 mm entspricht. Das bewegliche System (obere Lidplatte-Zeiger-Gegengewicht) ist derart ausgewuchtet, daß die obere Lidplatte mit möglichst wenig Druck, gerade aber noch mit eigenem Antrieb, arbeitet. Dieses Gerät besitzt dem Meßinstrument von Kückle und Löser gegenüber den Vorteil, daß infolge der isotonischen Gewichtsanordnung der Druck der oberen Meßplatte auf das zu messende Lidödem unabhängig vom Abstand der Meßplatten, also der jeweiligen Liddicke, ist. Damit konnte die Möglichkeit einer verschiedenen Kompression während der Messung weitgehend ausgeschaltet werden. Außerdem erlaubt die Parallelität der Meßplatten ein exaktes Erfassen der größten Liddicke, wobei die bogenförmige Meßskala in allen

Meßbereichen unverzerrte Werte wiedergibt. Die Methode erscheint für die Messung des Ödems, das sich nach einer UV-Bestrahlung ausbildet, sehr geeignet zu sein. Es bleibt nach der UV-Bestrahlung, wie er sie anwendet, über mehrere Tage ein Ödem nach dieser Methode nachweisbar. Neben der Schwellung ist immer gleichzeitig eine starke Rötung zu finden. Das bei der Entzündung entstehende Sekret dagegen stört nur wenig. Bei Applikation von Flüssigkeiten aber bleibt das Ödem in seinem Ausmaß gering.

4.2.3. Beurteilung der Rötung

Direkte photometrische Messung der Rötung ist bei der geringen Größe und Inhomogenität des Objektes nicht möglich.

5. Photographische Darstellungsverfahren

Zur Beurteilung der Rötung erschien uns ein photographisches Darstellungsverfahren am zweckmäßigsten, da selbst Reizung mit schwach reizenden Substanzen eine Rötung der Konjunktiven bewirkt. Das sich bildende Ödem kann zusätzlich zur Beurteilung des Reizes herangezogen werden.

5.1. Bindehautphotographie

Strohmeier (9) hat in seiner Arbeit auf Schwierigkeiten hingewiesen, die bei der Bindehautphotographie entstehen, und weist u.a. auf Folgendes hin:

1. Durch die feuchte Schleimhaut entstehen lebhaftere Reflexe und Spiegelungen.
2. Die Bindehautgewebe verlaufen in verschiedenen Richtungen. Sie können nur bei Aufricht photographiert werden. Für gute Aufnahmen ist daher eine ausreichende Tiefenschärfe

notwendig. Durch das Auflicht ist außerdem das optische Auflösungsvermögen sehr eingeschränkt.

3. Strohmeier empfiehlt Blitzlicht, da die Versuchstiere die Augen nicht genügend ruhig halten können.
4. Das Mikroskop, das der Beobachtung dient, kann durch ein geeignetes Photogerät ersetzt werden.
5. Es stehen grundsätzlich 2 verschiedene Aufnahmemöglichkeiten zur Verfügung:
 - 1.: Spaltlampe mit dazugehöriger Photoeinrichtung.
 - 2.: Kleinbildkamera mit Mikroskopaufsatz.Kapillarmikroskopische Aufnahmen mit 40-50facher Vergrößerung.

5.2. Aufnahmen mit Hilfe der Photospaltlampe

Honegger (10) empfiehlt die Zeissphotospaltlampe als eine wesentliche Weiterentwicklung auf dem Gebiete der Bindehautphotographie. An die Zeissphotospaltlampe wird mit Hilfe eines Gewindes eine Kleinbildkamera angebracht. Die Photographie erfolgt durch den Objektivstrahlengang, was mit Hilfe eines Teilers und eines Adapters ermöglicht wird. Die Beobachtung erfolgt genau so, wie bei einer sonst üblichen Spaltlampenuntersuchung. Der Nachteil, daß durch die Lichtteilung nur 50 % des Lichtstroms für den Film verfügbar sind, wiegt nach seiner Ansicht nicht schwer. Die Bindehaut liegt auf der weißen Sklera und es steht deshalb immer noch eine ausreichende Beleuchtungsintensität zur Verfügung. Die Vorteile der Photoeinrichtung mit Spaltlampe sind:

1. Hohe Primärvergrößerung,
2. Gute Beobachtungs- und Blitzeinrichtung.

Das Hornhautmikroskop an der Spaltlampe ist mit dem Beleuchtungsarm zentrisch justiert. Der Lichtstrom zur Beobachtung ist trotz des Teilers wesentlich besser als bei der Spiegelreflexkamera. Im Beleuchtungsarm der Spaltlampe ist das Blitzlicht so angeordnet, daß es im gleichen Strahlengang verläuft. Die bei der Beobachtung sichtbaren Reflexe stimmen mit denen des Blitzlichts weitgehend

überein. Das Verfahren ist technisch einfach: Das Photographieren findet während der Spaltlampenbeobachtung statt. Eine erhöhte Aufmerksamkeit muß lediglich auf die Reflexe gerichtet werden. Bestimmte Bindehautstellen lassen sich auch in größeren zeitlichen Abständen wieder auffinden und in der gleichen Weise photographisch belegen.

6. Material und Methoden

Als Grundlage für unsere Versuche diente uns das auf S.5 beschriebene Verfahren nach Draize (1).

6.1.1. Versuchstiere:

Als Versuchstiere standen uns 10 Kaninchen verschiedener Rassen zur Verfügung. Die Tiere wurden in automatischen Ställen gehalten und mit Trockenfutter und Wasser gepflegt. Während der Versuche wurden die Tiere in Haltevorrichtungen festgehalten.

Testlösungen: Als Testlösung verwendeten wir die Rheinfelder Sole in einer Konzentration von 30 g Salz pro 1000 ml Lösung. Eine genaue Analyse der Sole ist im Anhang C beigelegt. Zusätzlich verwendeten wir Proben aus den 3 Braunkohleseen: Nordfeld, Edelmanweiher und Knappensee (Analysen siehe Anhang C).

6.1.2. Reizbeurteilung:

Die Reizwirkung hielten wir mit einer Spiegelreflexkamera vom Typ Exakta mit Balgenvorsatzgerät fest. Die Vergrößerung bei diesem Verfahren ist eine 2-4fache Lupenvergrößerung. Die Kamera wurde auf einem Kinostativ befestigt. Der Kopf der Versuchstiere wurde in der Tierhaltevorrichtung festgehalten und konnte so mit der Hand in eine günstige Aufnahmeposition gebracht werden. Der Aufnahmeabstand zwischen Kaninchenauge und Balgengerät betrug etwa 11 cm. Die 2 Blitzgeräte der Marke

Braun wurden in einem Abstand von 30 cm vom Kaninchenauge befestigt. Der Einfallswinkel des Blitzgerätes war 45 Grad. Leit-
zahl des Blitzgerätes: 44 (für Blende 11, 18 DIN Film). Wir
verwendeten Blende 8-11 bei einer Verschußzeit von einer 1/30
Sekunde.

6.1.3. Punkteskala zur Reizbeurteilung

Die Reizung der Konjunktiven wurde nach einer Skala bewertet,
die sich an die Punkteskala von Friedenwald (4) anlehnt.
Die Punkteskala ist im Folgenden wiedergegeben:

Einteilung der Reizstufen am Kaninchenauge:
(Photobeispiele S. 41)

Normale Konsistenz, normale Durchblutung der Konjunktiven	0 Punkte
Gefäße der Konjunktiven leicht über normal durchblutet, leichte Rötung feststellbar	1 Punkt
Gefäße deutlich über normal durchblutet, leichte Sekretabsonderung, insgesamt Ein- druck einer leichten Entzündungsröte, leichtes Ödem	2 Punkte
Tiefes Karmesinrot, Ödem stärker ausgeprägt	3 Punkte
Diffuses Rot, einzelne Gefäße nicht mehr unterscheidbar, stark ausgeprägtes Ödem	4 Punkte

6.2.1. Versuchsvorgang, Anwendung der Methode nach Draize (Methode 1) Beschreibung:

1 ml der Testlösung wird mit Hilfe einer Pipette in den unteren
Konjunktivalsack des Kaninchenauges geträufelt. Der Kopf des
Kaninchens wird in eine günstige Position für die photographische
Aufnahme gebracht. Dieser Vorgang wird bei sämtlichen 10 Ver-

suchstieren wiederholt. Die Testlösung wird jeweils in das linke Auge des Versuchstieres eingeträufelt.

Um die individuellen Empfindlichkeitsunterschiede bei den Tieren zu berücksichtigen, wird das rechte Auge des Versuchstieres mit physiologischer Kochsalzlösung beträufelt. Das rechte, mit physiologischer Kochsalzlösung beträufelte Auge wird dann mit dem linken Auge verglichen, das mit dem gleichen Quantum an Testlösung beträufelt wurde.

Als Testlösungen für die Methode nach Draize wurden Proben der Rheinfelder Sole und Wasserproben der Braunkohleseen Nordfeld (N) Edelmanweiher (E) und Knappensee (K) verwendet, deren Analysen im Anhang C wiedergegeben sind.

Die Reizung am Auge wurde nach 15 Min., 1 Stunde und 24 Stunden abgelesen. Falls eine Reizung festgestellt wurde, wurde sie wie in 6.1.2. beschrieben, photographisch festgehalten. (Beispiele im Anhang)

6.2.2. Testung der Rheinfelder Sole nach der Methode 1 (Siehe Tabelle 1, Anhang A)

Die 1ml Testlösung, eine 30 g/1000 ml Verdünnung der Rheinfelder Sole konnte den Versuchstieren ohne Schwierigkeiten eingeträufelt werden. Es konnte bei keinem der drei Ablesezeitpunkte bei einem Versuchstier ein Reiz festgestellt werden.

Ergebnis: Als Ergebnis der Versuchsreihe können wir festhalten, daß eine einmalige Applikation von 1ml Testlösung der Rheinfelder Sole in den Konjunktivalsack des Kaninchenauges keinen meßbaren Reiz hervorruft. Die Ablesung nach der Punkteskala (siehe 6.1.3.) waren nach 15 min. 1 Std. und 24 Std. negativ. Ein Unterschied zwischen dem linken mit Testlösung gereiztem Auge und dem rechten, mit physiologischer Kochsalzlösung beträufeltem Auge konnte nicht festgestellt werden. Bei sämtlichen Ablesevorgängen wurde die Reizstufe 0 festgestellt. Ein Reizindex wurde deshalb auch nicht errechnet.

6.2.3. Testung des K.-sees nach Methode 1

(Siehe Anhang Tabelle 2! Anhang A)

Die 1ml Testlösung aus dem K.-see erzeugte wie die Rheinfelder Sole an den Konjunktiven der Kaninchenaugen keinen Reiz.

Ergebnis:

Eine einmalige Applikation einer Wasserprobe aus dem K.-see in den Konjunktivalsack des Kaninchenauges ruft keinen meßbaren Reiz hervor.

6.2.4. Testung einer Probe aus dem E.-see nach Methode 1

(Siehe Anhang Tabelle 3! Anhang A)

Die 1ml Testlösung aus dem E.-see erzeugte - wie die beiden oben-
genannten Wässer - keinen meßbaren Reiz.

Ergebnis:

Siehe Tabelle 6.2.2.

6.2.5. Testung einer Probe aus dem N.-see nach der Methode 1

(Siehe Anhang Tabelle 4! Anhang A)

Im Gegensatz zu den obengenannten Wasserproben bewirkt die Probe aus dem N.-see bei sämtlichen 10 Versuchstieren eine Reizung. Das mit der Wasserprobe gereizte Auge ist deutlich hinsichtlich der Rötung von dem mit physiologischer Kochsalzlösung gereizten Auge zu unterscheiden. Bei 5 Versuchstieren wurde nach 15 Min. ein Reiz der Stufe 1 festgestellt und bei den anderen 5 Versuchstieren ein Reiz der Stufe 2. Nach einer weiteren Stunde wurde bei einem weiteren Versuchstier ein Reiz der Stufe 2 festgestellt. Nach 24 Stunden konnte bei keinem der Versuchstiere mehr ein Reiz festgestellt werden.

Den aus dem Durchschnitt ermittelten Reizwert bezeichnen wir als Reizindex.

Da wir 10 Versuchstiere zur Verfügung hatten, ist demnach nach 15 Min. der Reizindex 1,5 und nach einer Stunde 1,6, nach 24 Stunden hat er wieder den Wert 0 erreicht.

Ergebnis:

Eine einmalige Applikation von 1 ml Testlösung aus dem N.-see ruft eine leichte bis mittlere Reizung an den Konjunktiven des Kaninchenauges hervor. 24 Stunden nach erfolgter Applikation der Testlösung kann kein Reiz mehr festgestellt werden.

6.3.1. Weiterentwicklung der Methode nach Draize

Methode 1a (Beschreibung der Methode)

Um eine Abstufung der Reizwirkung am Kaninchenauge zu erhalten, änderten wir die Methode nach Draize (6.2.1.) in einigen Punkten ab.

Beibehalten wurde die Punkteskala zur Reizbeurteilung (6.1.3.) und die photographische Aufnahmetechnik.

Geändert wurde die Applikationsart:

Die Testlösungen werden nicht mehr mit der Pipette in die Augen der Kaninchen eingeträufelt. Die Pipette wird durch ein im Klinikbetrieb übliches Infusionsbesteck, das mit einer Infusionsflasche gekoppelt ist, ersetzt. Die Infusionsflasche enthält die Testlösung. Die Flüssigkeitsmenge, die durch diese Vorrichtung fließt, wird auf 10 Tropfen pro Minute festgelegt, was etwa einer Menge von 0,5 ml pro Minute entspricht. Das linke Auge wird nach der obengenannten Methode mit Testlösung beträufelt, während das rechte Auge nach derselben Methode mit physikalischer Kochsalzlösung beträufelt wird.

Die Versuchstiere und alle übrigen Einzelheiten der Versuchsdurchführung entsprechen der Methode 1.

6.3.2. Testung der Rheinfelder Sole nach der Methode 1a (Siehe Tabelle 5 im Anhang A!)

Die Testlösung konnte nach der Methode 1a ohne Schwierigkeiten in den Konjunktivalsack der Versuchstiere eingeträufelt werden. Der Konjunktivalsack mußte manuell über den Zeitraum der Ein-

wirkungszeit vorgezogen werden (20 Minuten lang), was nur mit Hilfe eines Assistenten möglich war.

Die Versuchstiere zeigten während der Einwirkungszeit heftige Abwehrreaktionen. Die Reaktionen der Versuchstiere waren wesentlich heftiger als bei der Versuchsanordnung 1. Eine starke Tränen- und Sekretabsonderung wurde zusätzlich festgestellt. Das manuelle Offenhalten der Lider begrenzte die Einwirkungszeit auf 20 Minuten.

Ergebnis:

Nach 20 Minuten konnte bei sämtlichen 10 Versuchstieren am mit Rheinfelder Sole beträufelten linken Auge ein leichter Reiz festgestellt werden. 9 Kaninchen zeigten einen Reiz der Stufe 1, ein (weißes Albino)-Kaninchen einen Reiz der Stufe 2. Der Reizindex für die Rheinfelder Sole nach der Methode 1a ist demnach 1,1. Nach einer Stunde konnte bei einem weiteren Kaninchen ein Reiz der Stufe 2 festgestellt werden. Der Reizindex nach einer Stunde war 1,2.

Auch die Dauerbeträufelung des rechten Auges rief bei der Mehrzahl der Versuchstiere eine leichte Reizung hervor. Bei 6 Versuchstieren wurde ein Reiz der Stufe 1 festgestellt, während bei 4 Versuchstieren kein Reiz festgestellt werden konnte. Der Reizindex bei der Verwendung von physiologischer Kochsalzlösung ist demnach nach 20 Min. 0,6, nach einer Stunde unverändert 0,6. Nach 24 Stunden konnte weder bei der Rheinfelder Sole noch bei der physiologischen Kochsalzlösung ein Reiz festgestellt werden.

Nach den nach unserer Versuchsanordnung erhaltenen Werten zeigt die Rheinfelder Sole eine etwas stärkere Reizwirkung als die physiologische Kochsalzlösung.

- 6.3.3. Testung einer Wasserprobe aus dem E.-see nach
der Methode 1a
(Siehe Tabelle 6 im Anhang A)

Ergebnis:

Nach 20 Minuten Einwirkungsdauer konnte bei 8 Versuchstieren ein Reiz der Stärke 1 festgestellt werden. Nach einer Stunde war das Ergebnis unverändert. Nach 24 Stunden konnte bei keinem der Versuchstiere mehr ein Reiz festgestellt werden. Der Reizindex nach 20 Minuten und nach einer Stunde ist demnach 0,8. Ein bemerkenswerter Unterschied zu dem Reizindex von 0,6 der bei physiologischer Kochsalzlösung festgestellt wurde, läßt sich nach unseren Ergebnissen nicht feststellen. Die Probe aus dem E.-see zeigt demnach keinen nennenswerten Unterschied zu der physiologischen Kochsalzlösung.

- 6.3.4. Testung einer Wasserprobe aus dem K.-see nach der
Methode 1a
(Siehe Tabelle 7 im Anhang A)

Ergebnis:

Nach 20 Minuten Einwirkungsdauer konnte bei 7 Versuchstieren ein Reiz der Stufe 1 und bei 3 Versuchstieren ein Reiz der Stufe 2 festgestellt werden. Der Reizindex nach einer Stunde ist demnach 1,3 und nach 20 Minuten 1,4. Insgesamt gesehen erzeugt die Wasserprobe aus dem Knappensee am Kaninchenauge einen Reiz, der leicht stärker ist als der Reiz, den die physiologische Kochsalzlösung hervorruft.

- 6.3.5. Testung einer Wasserprobe aus dem N.-see nach der
Methode 1a
(Siehe Tabelle 8 im Anhang A)

Ergebnis:

Die Reizung, die die Probe aus dem N.-see hervorruft, ist wesent-

lich stärker als bei den bisher getesteten Lösungen. Die Kaninchen zeigen starke Abwehrreaktionen. Die Augen sämtlicher Versuchstiere wiesen nach 20 Minuten eine starke Rötung auf. Das Augenlid und die Nickhaut waren stark gerötet. Außerdem wiesen die Lider und die Nickhaut ein starkes Ödem auf. Bei allen 10 Versuchstieren konnte nach 20 Minuten ein Reiz der Stärke 3 festgestellt werden, nach einer Stunde war der Reizindex unverändert 3,0. Nach 24 Stunden konnte noch bei allen Versuchstieren ein Reiz der Stufe 1 festgestellt werden.

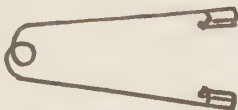
Die starken Abwehrreaktionen und die Reflexbewegungen der Versuchstiere besonders mit dem Kopf und den Hinterläufen, erschwerten die Durchführung des Versuches. Insgesamt bedingt die Wasserprobe aus dem Nordsee eine starke Rötung und Schwellung des Kaninchenauges. Der Unterschied der Reizwirkung der physiologischen Kochsalzlösung ist erheblich.

7. Methode 2 - Lidspannermethode

7.1. Versuchsanordnung (Beschreibung der Methode 2)

Bei der Methode 2 werden sämtliche Versuchsanordnungen der Methode 1a übernommen. Der einzige Unterschied zur Methode 1a besteht darin, daß die manuelle Spannung des Lides durch mechanische Lidspanner ersetzt wird. Als Vorbild dienten uns Lidspanner, wie sie in der Augenklinik verwendet werden. Entsprechend verkleinerte Lidspanner wurden vom Mechaniker des Instituts, Herrn Taerner, dankenswerterweise angefertigt. Als Material diente Nickeldraht. Die nötige Kraft der Spannung des Lides wird durch die Federkraft der Spirale erzeugt.

Bild des Lidspanners in Originalgröße (Photo Anhang B)



In das rechte und in das linke Auge des Versuchstieres werden vorsichtig 2 Lidspanner eingesetzt. Verletzungen des Auges beim Einsetzen der Spanner müssen nach Möglichkeit ausgeschaltet werden. Der Infusionsschlauch wird zwischen den Ohren des Versuchstieres durchgeführt und mit einem Klebeband fixiert. Am Lidspanner wird der Infusionsschlauch mit einem Bindfaden befestigt.

7.1.2. Testung der Rheinfelder Sole nach der Methode 2

Bei der Anwendung der Methode 2 gab es mehrere Schwierigkeiten. Alle Versuchstiere sträubten sich heftig gegen das Einsetzen der Lidspanner. Leichte Verletzungen der Schleimhäute konnten wegen der schnellen Lidbewegungen und ruckartigen Kopfbewegungen der Versuchstiere nicht immer vermieden werden. Die Versuche mußten des öfteren wiederholt werden, da es den Versuchstieren manchmal gelang, die Lidspanner aus den Augen zu entfernen.

Ergebnis:

Bei 6 Versuchstieren wurde am linken Auge nach 20 Minuten die Reizstufe 1 festgestellt, während 4 Versuchstiere kleine konjunktivale Blutungen an den Auflagestellen der Lidspanner aufwiesen. An den rechten Augen, die ebenfalls mit Lidspanner offengehalten wurden und in gleicher Weise beträufelt wurden, konnten bei 5 Versuchstieren ein Reiz der Stufe 1 festgestellt werden, während die anderen 5 Versuchstiere kleinere Gefäßläsionen an den Auflagestellen der Lidspanner zeigten. Die Größe der Läsionen entspricht etwa der Größe der Auflagefläche der Spanner auf die Konjunktiven. Nach 24 Stunden waren bei keinem der Versuchstiere mehr Läsionen oder eine andere Reizwirkung

feststellbar. Nach der Versuchsanordnung 2 bewirkt die Rheinfelder Sole keine stärkere Reizwirkung als sie bei der Anwendung der Methode mit physiologischer Kochsalzlösung erhalten wird. Kleine Gefäßläsionen treten zusätzlich auf.

7.1.3. Testung einer Wasserprobe aus dem E.-see nach der Methode 2

Ergebnis:

Nach 20 Minuten konnte bei sämtlichen Versuchstieren ein Reiz der Stärke 1 gemessen werden. Die in 7.1.2. erwähnten Läsionen der Konjunktiven waren dieselben. Das Reizergebnis nach einer Stunde war unverändert. Es konnte kein Unterschied zwischen der Reizung mit der Wasserprobe aus dem E.-see und der physiologischen Kochsalzlösung festgestellt werden. Nach 24 Stunden waren keine Läsionen mehr sichtbar.

7.1.4. Testung einer Wasserprobe aus dem K.-see nach der Methode 2

Ergebnis:

Nach 20 Minuten Einwirkungsdauer der Wasserprobe auf die linken Augen der Versuchstiere konnte bei 8 Tieren die Reizstufe 1 festgestellt werden, bei 2 Versuchstieren waren starke Blutungen an den Auflageflächen der Lidspanner aufgetreten. Das Reizergebnis war nach einer Stunde unverändert und nach 24 Stunden war kein Reiz mehr zu sehen. Ein Unterschied zwischen der Reizung mit der Wasserprobe aus dem K.-see und der physiologischen Kochsalzlösung war nicht zu bemerken. Im übrigen trifft das in 7.1.3. Erwähnte zu.

7.1.5. Testung einer Wasserprobe aus dem N.-see nach der
Methode 2

Ergebnis:

Die Wasserprobe aus dem N.-see rief an den linken Augen der Versuchstiere eine starke Reizung hervor. Bei sämtlichen 10 Versuchstieren wurde ein Reiz der Stufe 3 hervorgerufen. Die Kaninchen zeigten sehr starke Abwehrreaktionen. Nach einer Stunde waren die Reizwerte unverändert.

Nach 24 Stunden konnte noch bei sämtlichen Tieren ein Reiz der Stufe 1 festgestellt werden. Nach 48 Stunden waren die Entzündungszeichen bei 9 Versuchstieren abgeklungen, während ein Tier die Zeichen einer manifesten Konjunktivitis aufwies.

Die Reizwirkung, die nach der Methode 2 erzielt wird, ist für die Wasserprobe aus dem N.-see erheblich. Die kleinen Läsionen, die eine Beurteilung der schwächer ionisierten Testlösungen erschweren, fallen bei der Wasserprobe aus dem N.-see nicht mehr ins Gewicht.

8. Entwicklung einer neuen Methode

Da die Methode 2 große Nachteile hatte, versuchten wir eine neue Methode zu entwickeln. Das Prinzip der Methode war, einen feinen Silikonschlauch direkt in den Konjunktivalsack einzusetzen. Damit konnten die Konjunktiven durch pertubierende Infusionen dauernd mit einer Testlösung befeuchtet werden. Die Kaninchen wurden durch diese Methode in keiner Weise belastigt. Genau ist diese Methode in der Arbeit von Peter Korzinek beschrieben (11). Wichtige Punkte mußten wir bei der Durchführung der Versuche beachten:

Für die Operationen mußte ein geeignetes Narkosemittel gefunden werden. Wir entschieden uns für Rompun^R der Firma Bayer-Leverkusen. Die Versuchstiere wurden durch dieses Mittel in einen empfindungsfreien Zustand versetzt. Zusätzlich verwendeten wir bei allen Operationen Xylokain^R zur örtlichen Betäubung. Als Schlauchmaterial verwendeten wir Silikon. Die Operationsbedingungen versuchten wir möglichst steril zu halten.

Silikon ist im allgemeinen sehr hautverträglich, weich und geschmeidig. Das Lumen dieses Schlauches (1 mm Ø) reicht aus, genügend Testflüssigkeit in die Konjunktiven zu bringen.

Sterilität: Um mikrobielle Infektionen zu vermeiden, versuchten wir die Operationen unter möglichst sterilen Bedingungen durchzuführen. Das Operationsbesteck wurde in einem Trockensterilisateur keimfrei gemacht, die Schläuche vor dem Einsetzen 1/2 Stunde in destilliertem Wasser gekocht.

Verschiedene operative Techniken wurden erprobt, wie sie Peter Korzinek in seiner Arbeit näher beschreibt (11). Am besten eignet sich folgende Methode, die Testung von Lösungen an den Konjunktiven vorzubereiten:

Der Konjunktivalsack wird mit den Fingern aufgezo-gen. Zum Auf-sperren des Auges werden kleine Haken verwendet. Der Einstich mit der Kanüle, durch die der dünne Schlauch geschoben werden soll, erfolgt temporal, möglichst nahe der Umschlagfalte des Auges. Die Kanüle wird anfangs am Auge entlang geschoben, bis man den knöchernen Rand der Orbita fühlt. Das Lid kann jetzt losgelassen werden. Danach wird die Haut temporal vom Auge

abgehoben. Die Kanüle wird dann weiter hinter der Orbita vorgeschoben bis zur ersten Austrittsstelle, etwa 2 cm hinter der Orbita. Der etwa 15 cm lange Schlauch wird nun durch die Nadel gezogen, die Kanüle wird zurückgezogen. Danach wird die Kanüle zwischen den Ohren eingestochen und subkutan zur ersten Austrittsstelle vorgeschoben. Der Schlauch wird in die Spitze der Nadel eingeführt und durchgeschoben. Die Kanüle wird anschließend zurückgezogen. Der Schlauch wird mit einer festen Naht an der Austrittsstelle, also zwischen den Ohren, fixiert. Der Knoten über dem Schlauch darf nicht zu fest gezogen werden, um das Schlauchlumen nicht zu stark einzuengen. Die erste Austrittsstelle wird vernäht, wobei der Schlauch hier noch einmal subkutan vernäht wird. Mit einer Spritze wird jetzt die Durchgängigkeit des Schlauches geprüft. Anschließend wird der Schlauch abgeschnitten. Dabei ist darauf zu achten, daß der Schlauch mit seinem freien Ende in den Konjunktivalsack hineinreicht und nicht in das leicht verschiebliche Gewebe im Bereich des Unterlides rutscht.

9. Diskussion

Beurteilung der in der Literatur beschriebenen Methoden

9.1. Stellungnahme zur Wickel- und Fleckchentechnik:

Die Wickeltechnik, wie sie im 3.1.1. beschrieben wird, eignet sich vorzüglich, Versuchslösungen in Kontakt mit der Haut von Versuchstieren oder Versuchspersonen zu bringen. Eine ähnliche Technik verwendeten auch Gärtner (12), Geiger (14), Hemmerich (15) und Rabanser (16).

Ebenso verwendbar ist die Fleckchentechnik, die in 3.1.2. beschrieben ist. Unsere Aufgabe aber war es, Lösungen hinsichtlich ihrer Reizwirkung auf die Schleimhaut von Versuchstieren zu untersuchen. Beim Kaninchen ist nur an 2 Stellen Schleimhaut an der Oberfläche vorhanden: am Penis des männlichen Kaninchens und am Auge. Der Penis schied für uns wegen seiner geringen Größe aus. Für die Schleimhaut des Auges kommt eine Fleckchentechnik nicht in Betracht. Ein auf das Auge der Versuchstiere aufgelegter Flecken oder Wickel bedingt einen reflektorischen Verschluss des Auges. Zusätzlich erschwert starke Tränensekretion eine Beurteilung der Reizwirkung.

9.2. Kurzfristiges Einträufeln

Besser dafür geeignet zu sein, eine Reizwirkung von Flüssigkeit auf die Mucosa zu testen, erscheint uns die einfache Methode, ein geringes Quantum an Flüssigkeit in den Konjunktivalsack der Versuchstiere zu träufeln. Letztere Methode ist in 2.1.5. beschrieben und von Draize (1) durchgeführt worden.

Wir verwendeten diese Methode mit einigen Verfeinerungen, wie auf den Seiten 12 und 13 beschrieben.

Dabei kamen wir zu dem Ergebnis, daß die Methode nach Draize nur anwendbar ist, wenn stärker reizwirksame Lösungen getestet werden sollen. Neutralsalz-Lösungen, wie die Rheinfelder Sole (Analyse siehe Anhang C) oder die Wasserproben aus dem K.-see und dem

E.-see, bewirken keinen meßbaren Reiz. Durch das Einträufeln des geringen Quantums an Testlösung erregten wir einen kurzen Abwehrreflex der Versuchstiere. Die Testflüssigkeit wird sofort nach dem Einträufeln wieder durch die Tränenflüssigkeit ausgeschwemmt. Anders ist es bei salinen Lösungen wie bei der Wasserprobe aus dem N.-see (Analyse siehe Anhang). Diese Wasserprobe erzeugt einen meßbaren Reiz.

Abschließend ist zu der Methode 1 zu bemerken:

Die Methode ist anwendbar, stärker reizwirksame Lösungen zu testen. Bei schwächer ionisierten Lösungen ist die Einwirkungs-dauer zu kurz, um zu einem meßbaren Ergebnis zu kommen.

9.3. Längerdauerndes Einträufeln

Die Nachteile der Methode 1 versuchten wir in der von uns entwickelten Methode 1a wie Seite 16 beschrieben, auszugleichen. Die Einwirkungs-dauer der Sole wurde mit 15-20 Minuten erheblich verlängert und die Einwirkungszeit angeglichen, wie sie Gärtner (12), Geiger (14), Hemmerich (15) und Rabanser (16) in ihren Versuchsreihen verwenden. Die Menge, die pro Zeiteinheit appliziert wird, konnte durch Verwendung eines kliniküblichen Infusionsbesteckes standardisiert werden. Dadurch, daß das rechte Auge gleichzeitig mit physiologischer Kochsalzlösung beträufelt wurde, konnte ein Reiz, der durch die Applikationsart ausgelöst wurde, leichter erfaßt werden.

Die Methode 1a scheint uns für die Erprobung der Reizwirkung schwächer ionisierter Lösungen auf die Konjunktiven von Kaninchenaugen verwendbar zu sein. Die Reizung der Konjunktiven mit den Testlösungen bewirkte einen deutlichen Unterschied zu der mit physiologischer Kochsalzlösung wie auf den Seiten 16 - 17 beschrieben. Die Methode 1a erwies sich aber als etwas umständlich. Der Konjunktivalsack des rechten und des linken Auges mußte ständig mit der Hand offengehalten werden, um einen reflektorischen Schluß des Auges durch das Versuchstier zu verhindern.

9.4. Lidspanner-Methode

Den im letzten Absatz erwähnten Nachteil versuchten wir dadurch auszugleichen, daß wir die auf Seite 18 beschriebenen mechanischen Lidspanner verwendeten. Es zeigte sich aber bald, daß es den Versuchstieren häufig gelang, die Spanner mit Hilfe der Augenmuskulatur aus dem Auge zu entfernen. Durch diese Abwehrhaltung kommt es häufig zu kleineren Läsionen der Konjunktiven an den Auflagestellen der Lidspanner.

Abschließend ist zu der Methode 2 zu bemerken:

Ein deutlich sichtbarer Unterschied in der Reizwirkung zwischen Testlösung und physiologischer Kochsalzlösung ist nur bei stärker ionisierten Lösungen, wie es beim N.-see der Fall ist, feststellbar. Bei Neutralsalzlösungen wird der Reiz, der durch die Testlösung hervorgerufen ist, durch den mechanischen Reiz, hervorgerufen durch die Lidspanner, überdeckt. Eine sinnvolle Anwendung der Methode 2 erscheint nur bei stärker ionisierten Lösungen möglich.

Eventuell kann eine Anwendung der Methode 2 bei stark sedierten Tieren in Betracht gezogen werden. Dies wurde aber von uns nicht weiter untersucht, da die in 8. beschriebene Perfusionsmethode diese Nachteile nicht aufweist und einfacher durchführbar ist.

9.5. Beurteilung der Perfusionsmethode

Die auf den Seiten 26-27 und in der Arbeit von meinem Kollegen P. Korzinek (11) genau beschriebene Methode scheint von allen Methoden am besten geeignet zu sein, die Reizwirkung von schwach ionisierten Lösungen auf die Konjunktiven von Kaninchen zu erproben. Auch K. Schmidt (13), der die von uns entwickelte Methode in seiner Arbeit anwendet, kommt zu diesem Ergebnis.

Das durch das operative Verfahren bedingte Lidödem bildet sich rasch wieder zurück und die Versuchstiere stehen schon nach kurzer Zeit zu Versuchsreihen zur Verfügung. Ein mechanischer Reiz, wie er durch die Lidspanner im Verfahren 2 bewirkt wird,

besteht nicht.

Auch die Nachteile des manuellen Offenhaltens des Auges entfällt. Es können gleichzeitig mehrere Testlösungen an verschiedenen Versuchstieren erprobt werden. Auch für das Perfusionsverfahren wurden die technischen Einzelheiten, die sich im Verfahren 1a bewährt hatten, beibehalten. Bei dem Perfusionsverfahren muß aber besondere Sorgfalt darauf verwendet werden, eine infektiöse Konjunktivitis, wie in 1.3. beschrieben, zu vermeiden. Sämtliche Instrumente wurden vor Versuchsbeginn in einem Drucksterilisator sterilisiert. Ebenso wurde mit den verwendeten Kanülen und Schläuchen vorgegangen. Wenn bei Anwendung der Perfusionsmethode einigermaßen sauber gearbeitet wird, erscheint sie uns gut geeignet zu sein.

9.6. Diskussion der Reizbeurteilung

Problematischer als die Reizverfahren scheinen die Möglichkeiten der Beurteilung der erzielten Reize zu sein.

1. Reizbewertung nach Punkten

Die Reizbewertung nach Punkten, wie sie Friedenwald (4) (siehe S. 12) einführt, hat den großen Nachteil, daß die Beurteilung des jeweiligen Entzündungsgrades subjektiv erfolgt. Der Untersucher versucht eindrucksmäßig die Entzündungserscheinungen, wie sie auf den Seiten 11-12 beschrieben sind, zu beurteilen und daraus Schlußfolgerungen zu ziehen. Ganz konnten wir auf eine subjektive Beurteilung der Reizwirkung nicht verzichten. Wir beschränkten uns in der Punktwertung der Reizung im wesentlichen auf die verschiedenen Abstufungen der Rötung, die aus dem gewonnenen Filmmaterial photometrisch bestimmt und damit meßtechnisch objektiviert werden kann. Den Grad der Rötung beurteilten wir aufgrund von Vergleichsaufnahmen, die dem jeweiligen Entzündungsgrad zugeordnet wurden. Die Vergleichsaufnahmen sind in ausgewählten Beispielen im Anhang und insgesamt im Institut einzusehen. Eine Kombination von photographischen Aufnahmen und einem Punktesystem, das die verschiedenen Grade der Reizung er-

faßt, erscheint eine brauchbare Möglichkeit zu sein.

2. Quantitative Meßverfahren

Ein quantitatives Meßverfahren zur Objektivierung von Entzündungszeichen wurde von Kückle und Löser (8) erprobt. Sie verwendeten als Kriterium der Entzündungsstärke die Entzündungstemperatur. Infolge der großen Temperaturschwankungen, die sie dabei feststellten (siehe S. 7), gaben sie dieses Verfahren bald wieder auf. Von uns wurde aufgrund der Erfahrung der erwähnten Autoren kein Versuch in dieser Richtung unternommen.

Erfolgversprechender scheint die Messung der Liddicke zu sein, wie auf S. 8 beschrieben. Die Autoren wendeten dieses Verfahren erfolgreich an. Wegen der Umständlichkeit des Verfahrens und des apparativen Aufwandes wendeten wir diese Methode in unseren Versuchen nicht an, haben sie aber auf den Seiten 8 - 9 näher beschrieben. Die Anwendung eines photographischen Verfahrens erschien uns mehr Erfolg zu versprechen.

9.6.3. Photographische Verfahren

Die Entzündungsröte ist ein wichtiges Kriterium der Entzündung. Eine photometrische Messung ist auf dem Filmmaterial, das wir verwendeten, möglich, wurde von uns aber nicht durchgeführt. Anfangs versuchten wir, kapillarmikroskopische Aufnahmen mit einer Robot-Kamera mit Mikroskopvorsatz anzufertigen. Die Veränderungen an der Bindehaut ließen sich durch den Mikroskopvorsatz gut beurteilen. Es zeigte sich aber als fast unmöglich, immer denselben Bildausschnitt herzustellen. Vergleichende Aufnahmen konnten so nicht angefertigt werden.

Eine Photospaltlampe, wie sie in 5.3. beschrieben ist, stand uns nicht zur Verfügung. Auf die Anschaffung einer Photospaltlampe verzichteten wir, da wir mit unserer Exacta Kleinbildkamera mit Balgenvorsatzgerät gute Ergebnisse erzielten. Mit der 2-4fachen Lupenvergrößerung ist es damit möglich, gute Aufnahmen zu machen, die eine deutliche Abstufung der Entzündungsröte erkennen lassen.

10. Zusammenfassung
1. Die Benetzung der Bindehaut mit Lösungen, die in therapeutischer Absicht oder z.B. beim Baden ins Auge gelangen, bewirkt u.U. ein Auftreten von Entzündungszeichen, deren Stärke von der Dosierung der Testlösung abhängig ist.
2. In der Literatur sind verschiedene Methoden beschrieben, reizungserzeugende Substanzen mit der Haut und Schleimhaut in Kontakt zu bringen.
2. a) Die Wickeltechnik:
Sie bringt die Flüssigkeit in beliebig langen Kontakt mit der Haut des Versuchsobjektes.
2. b) Die Injektionstechnik ist nur für spezielle Hauttests zu empfehlen.
2. c) Träufeltechniken:
Bei diesen Techniken wird die Testlösung in den Konjunktivalsack des Versuchstieres eingebracht. Diese Methode diente uns als Grundlage für die Entwicklung neuer Methoden.
3. In der Literatur sind 3 Methoden beschrieben, den Entzündungsgrad des Kaninchenauges zu beurteilen:
3. a) Die Bestimmung der Entzündungstemperatur,
3. b) Die Messung der Liddicke,
3. c) Photographische Darstellungsverfahren, darunter die Aufnahmetechnik mit der Photospaltlampe.
4. Wir erprobten die Träufeltechnik nach Draize mit einigen Varianten - mit dieser Methode können bei der Testung stärker ionisierter Lösungen zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden - und entwickelten aufgrund unserer Ergebnisse eine neue Methode.
Sie wurde von uns in einigen Punkten verbessert, daß auch Neutralsalz-Lösungen einen meßbaren Reiz erzeugen.
5. Zur Bewertung des Reizes verwendeten wir ein photographisches Darstellungsverfahren, das mit einem Bewertungs-

system nach Punkten gekoppelt wurde.

6. Um den Nachteil des manuellen Offenhaltens der Lider zu beseitigen, verwendeten wir mechanische Lidspanner. Die mechanischen Lidspanner haben aber den Nachteil, daß an der Auflagefläche auf der Konjunktiva kleine Läsionen erzeugt werden.
7. Von P. Korzinek und mir wurde eine Methode entwickelt, die sich für die Testung von Neutralsalzlösungen als sehr geeignet erweist. Bei dieser Methode wird ein Silikon-schlauch durch Pertubation in den Konjunktivalsack eingeführt. Mit Hilfe dieses Schlauches ist es möglich, die Konjunktiven für einen längeren Zeitraum der Reizwirkung einer Lösung auszusetzen.
8. Nach den Ergebnissen, die wir in unseren Untersuchungen erhielten, erweist sich die Pertubations-Methode für die Untersuchung von wässrigen Lösungen hinsichtlich ihrer Reizwirkung auf Schleimhäute am besten geeignet.

Literaturverzeichnis

1. Draize, J.H. und
Woodard, G.:
- Methods for the study of irritation
and toxicity of substances applied
topically to the skin and mucous
membranes -
J. of Pharmacology and Exp. Thera-
peutics 82, S. 377-390
1944
2. Böke, W.
in Axenfeld.:
- Lehrbuch der Augenheilkunde
Springer-Verlag, Hamburg, 11. Auf-
lage, S. 215-217
1973
3. Engelking, E. und
Leydecker, W.:
- Grundriß der Augenheilkunde
Springer-Verlag Hamburg, S. 63-64
1972
4. Friedenwald, J.S.
Hughes, W.F. jr. und
Herrmann, M.:
- Methodes of evaluation of skin
reaktions -
Archives of Ophthalmology, 31 S.279
1944
5. Schwartz, L. und
Peck, S.M.:
- studies of eye irritation in rabbits-
Publik Health Reports 59, S. 546
1944
6. Landsteiner, K. und
Jackobs, J.:
- studies of skin sensitisation
J.Expt.Med., 61, S. 643
1935

- | | |
|--|--|
| 7. Brock, N.,
Kottmeier, J.,
Lorenz, D. und
Veigel, H.: | - Zur Frage der antiphlogistischen
Wirkung von Azulen im Tierversuch -
Archiv für exp. Pathologie und
Pharmakologie
233. bd.5.Heft, S. 450-464
1954 |
| 8. Kühle, H.J. und
Loeser, A.: | - Messung von Lidödemen -
Zentralblatt exper. Medizin
S. 117, 369
1951 |
| 9. Strohmeier, K.: | - Die photographische Darstellung
des Gefäßnetzes -
Z.wiss.Mikroskopie
S. 129-134 3/1964 |
| 10. Honegger, D. und
Schäfer, W.: | - Kapillarmikroskopie an der Binde-
haut -
Med.Wschr. S. 61-62 2/1969 |
| 11. Korzinek, P.
12. Gärtner, Ch.
13. Schmidt, K.
14. Geiger, H.
15. Hemmerich, E.
16. Rabanser, M. | - med. Doktorarbeiten zur Zeit in
bearbeitung -
Institut für med. Balneologie und
Klimatologie Universität München |

A n h a n g A

V e r s u c h s e r g e b n i s s e

Tabellen 1 - 4: Methode nach Draize

1 ml der Testlösung wird in das linke Auge des Versuchstieres eingeträufelt (siehe Text S. 13).

In das rechte Auge wird zum Vergleich physiologische Kochsalzlösung geträufelt.

Tabelle 1

Methode 1: Testlösung: Rheinfelder Sole - 30 g Salz / 1000 ml

Hase	Reizstärke nach					
	15 Min.		1 Std.		24 Std.	
	r.	li-	r.	li.	r.	li.
A	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
B	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
C	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
D	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
E	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
F	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
G	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
H	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
I	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
K	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
Reizindex	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0

Tabelle 2

Methode 1: Testlösung: Wasserprobe aus dem K.-see

Hase	Reizstärke nach					
	15 Min.		1 Std.		24 Std.	
	r.	li.	r.	li.	r.	li.
A	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
B	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
C	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
D	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
E	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
F	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
G	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
H	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
I	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
K	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
Reizindex	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0

Tabelle 3

Methode 1: Wasserprobe aus dem E.-see

Hase	Reizstärke nach					
	15 Min.		1 Std.		24 Std.	
	r.	li.	r.	li.	r.	li.
A	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
B	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
C	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
D	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
E	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
F	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
G	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
H	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
I	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
K	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
Reizindex	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0

Tabelle 4

Methode 1: Wasserprobe aus dem N.-see (siehe S.

Hase	Reizstärke nach					
	20 Min.		1 Std.		24 Std.	
	r.	li.	r.	li.	r.	li.
A	0	/ 1	0	/ 2	0	/ 0
B	0	/ 1	0	/ 1	0	/ 0
C	0	/ 2	0	/ 2	0	/ 0
D	0	/ 1	0	/ 1	0	/ 0
E	0	/ 1	0	/ 1	0	/ 0
F	0	/ 2	0	/ 2	0	/ 0
G	0	/ 1	0	/ 1	0	/ 0
H	0	/ 2	0	/ 2	0	/ 0
I	0	/ 2	0	/ 2	0	/ 0
K	0	/ 2	0	/ 2	0	/ 0
Reizindex	0	/ 1,5	0	/ 1,6	0	/ 0

Tabellen 5 - 8: Weiterentwickelte Methode nach Draize (siehe Text S. 15).

Linker Wert in der Tabelle: Reizwert nach Einwirken der Testlösung

Rechter Wert in der Tabelle: Reizwert nach Einwirken von physiologischer Kochsalzlösung

Tabelle 5

Methode 1a: Testlösung: Rheinfelder Sole - 30 g Salz / 1000 ml

Hase	Reizstärke nach					
	20 Min.		1 Std.		24 Std.	
	r.	li.	r.	li.	r.	li.
A	0	/ 1	0	/ 1	0	/ 0
B	1	/ 1	1	/ 1	0	/ 0
C	1	/ 1	1	/ 1	0	/ 0
D	0	/ 1	0	/ 1	0	/ 0
E	0	/ 1	0	/ 2	0	/ 0
F	1	/ 2	1	/ 2	0	/ 0
G	1	/ 1	1	/ 1	0	/ 0
H	1	/ 1	1	/ 1	0	/ 0
I	0	/ 1	0	/ 1	0	/ 0
K	1	/ 1	1	/ 1	0	/ 0
Reizindex	0,6 / 1,1		0,6 / 1,2		0 / 0	

Tabelle 6

Methode 1 a: Wasserprobe aus dem E.-see

Hase	Reizstärke nach					
	20 Min.		1 Std.		24 Std.	
	r.	li.	r.	li.	r.	li.
A	1	/ 1	1	/ 1	0	/ 0
B	1	/ 1	1	/ 1	0	/ 0
C	1	1	1	1	0	0
D	0	/ 0	0	/ 0	0	/ 0
E	1	/ 0	1	/ 0	0	/ 0
F	1	/ 1	0	/ 1	0	/ 0
G	0	/ 1	0	/ 1	0	/ 0
H	1	/ 1	1	/ 1	0	/ 0
I	0	/ 1	0	/ 1	0	/ 0
K	0	/ 1	0	/ 1	0	/ 0
Reizindex	0,6 / 0,8		0,6 / 0,8		0 / 0	

Tabelle 7

Methode 1 a: Wasserprobe aus dem K.-see

Hase	Reizstärke nach					
	20 Min.		1 Std.		24 Std.	
	r.	li.	r.	li.	r.	li.
A	0	/ 1	0	/ 1	0	/ 0
B	1	/ 2	1	/ 2	0	/ 0
C	1	/ 1	1	/ 1	0	/ 0
D	0	/ 1	0	/ 1	0	/ 0
E	1	/ 2	1	/ 2	0	/ 0
F	1	/ 2	1	/ 2	0	/ 0
G	0	/ 1	0	/ 1	0	/ 0
H	1	/ 1	1	/ 1	0	/ 0
I	0	/ 1	0	/ 1	0	/ 0
K	0	/ 1	0	/ 1	0	/ 0
Reizindex	0,6 / 1,3		0,6 / 1,3		0 / 0	

Tabelle 8

Methode 1 a: Wasserprobe aus dem N.-see

Hase	Reizstärke nach					
	20 Min.		1 Std.		24 Std.	
	r.	li.	r.	li.	r.	li.
A	0	/ 3	0	/ 3	0	/ 1
B	1	/ 3	1	/ 3	0	/ 1
C	1	/ 3	1	/ 3	0	/ 1
D	0	/ 3	0	/ 3	0	/ 1
E	1	/ 3	1	/ 3	0	/ 1
F	1	/ 3	1	/ 3	0	/ 1
G	1	/ 3	1	/ 3	0	/ 1
H	1	/ 3	1	/ 3	0	/ 1
I	0	/ 3	0	/ 3	0	/ 1
K	0	/ 3	0	/ 3	0	/ 1
Reizindex	0,6 / 3,0		0,6 / 3,0		0 / 1,0	

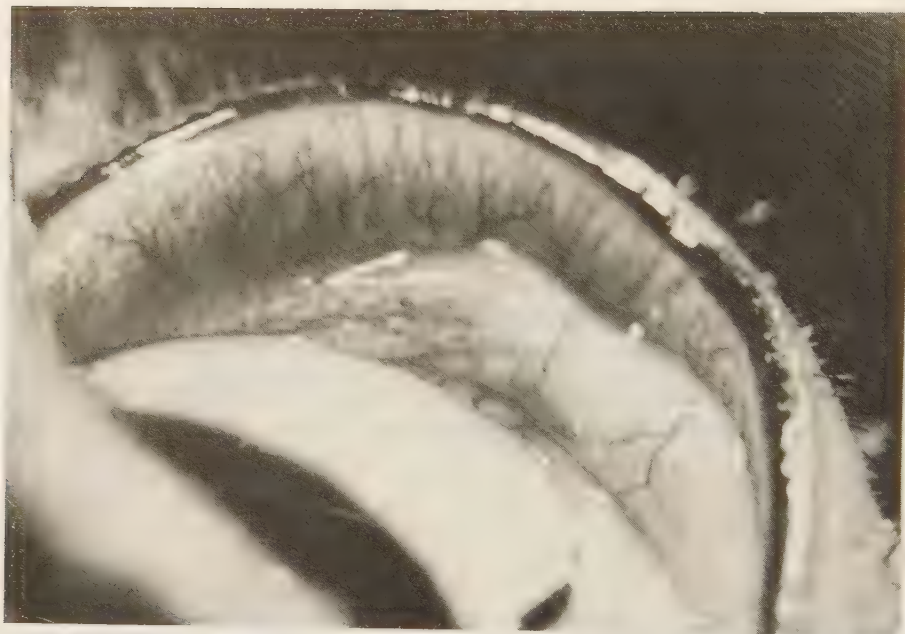
A n h a n g B

P h o t o b e i s p i e l e :

- 1 Kaninchenauge mit Lidspanner
- 2 Kaninchenauge, Zustand vor Reizung
- 3 Kaninchenauge, Reizstufe 1
- 4 Kaninchenauge, Reizstufe 1-2

(Die Abstufung der Reizstärken ist auf den farbigen
Originalaufnahmen besser zu erkennen)





2



3



A n h a n g C

Analyse der Bohrlochsole von Rheinfelden

Probeentnahme: Soleleitung Inhalatorium

Tag: 19. Oktober 1961

		mg/l
Lithium	Li	6,25
Natrium	Na	125'000,0
Kalium	K	45,5
Calcium	Ca	1,406,8
Magnesium	Mg	184,8
Eisen	Fe /Fe	3,0
Kupfer	Cu	0,15
		126,646,5
Chlorid	Cl	188,270,0
Sulfat	SO ₄	4,204,5
Bromid	Br	(6,77)
Jodid	J	(Spur)
Fluorid	F	(111,76)
		192,593,03

pH Wert

7,06 bei 20° C.

Die Analysen wurden vom Laboratorium der Vereinigten Schweizerischen Rheinsalinen durchgeführt.

Schweizerhalle, den 23. März 1962

Chemische Untersuchung

Abdampfrückstand: (180° C)

K :	3,478	g/l
N :	3,472	g/l
E :	486	mg/l

Glührückstand: (600° C)

K :	3,326	g/l
N :	2,848	g/l
E :	374	mg/l

Glühverlust: (180° C - 600° C)

K :	152	mg/l
N :	624	mg/l
E :	112	mg/l

Oxidierbarkeit: (K Mn O₄)

K :	6,280	mg/kg
N :	7,567	mg/kg
E :	3,383	mg/kg

In einem Liter des Wassers sind enthalten:

<u>E</u> :		Milligramm mg
<u>Kationen:</u>		
Natrium	(Na ⁺)	4,71
Kalium	(K ⁺)	5,16
Calcium	(Ca ²⁺)	81,00
Magnesium	(Mg ²⁺)	18,22
Eisen	(Fe ²⁺)	8,38
	Summe	117,47

<u>Anionen:</u>		
Chlorid	(Cl ⁻)	9,31
Sulfat	(SO ₄ ²⁻)	322,5
	Summe	449,28

✓ :

<u>Anionen:</u>		
Chlorid	(Cl ⁻)	25,42
Sulfat	(SO ₄ ²⁻)	1876,0
	Summe	2655,0

Analyse der Wasserproben aus dem Knappensee, dem Nordfeld- und Edelmanweiher, mit K, N und E bezeichnet.

K.-see

	Milligramm
	mg
<u>Kationen:</u>	
Natrium (Na^+)	537,0
Kalium (K^+)	52,1
Calcium (Ca^{2+})	338,1
Magnesium (Mg^{2+})	19,3
Eisen (Fe^{2+})	0,04
Summe	948,34

Anionen:

Chlorid (Cl^-)	31,88
Nitrat (NO_3^-)	3,45
Sulfat (SO_4^{2-})	2255,8
Summe	3239,47

EN :

Kationen:

Natrium (Na^+)	8,04
Kalzium (K^+)	4,52
Calcium (Ca^{2+})	324,9
Magnesium (Mg^{2+})	81,56
Eisen (Fe^{2+})	335,1
Summe	754,12

Für die Überlassung des Themas danke ich den Herrn Prof. Dr.
Drexel und Dipl. Phys. Dirnagel.

Letzterem danke ich besonders für die hilfreiche Unterstützung
bei der Durchführung der Versuche.

Außerdem danke ich allen übrigen Mitarbeitern des Instituts
für Medizinische Balneologie und Klimatologie.

Lebenslauf

Bernhard Allgayer

geboren am 9.3.1950 in Dillingen/Donau

Eltern Dr. Alois Allgayer, Notar
Gertraud Allgayer, geb. Hogen

Schulen 1956-1960 Volksschule Lauingen
1960-1969 Johann-Michael-Sailer-Gymnasium
Dillingen

Abitur Sommer 1969

Universität Freie Universität Berlin 1969-1972
Technische Universität München 1972-1975

Staatsexamen 1975

